

## مطالعه رنگبری زیستی رنگزاهای زانتان، با استفاده از لاکاز اسپوری براساس طیفسنجی لیزری

زینب صابری<sup>۱</sup>، سهیل شریفی<sup>۲\*</sup>، علی مخدومی<sup>۳</sup>، الهه اسدی شمس آبادی<sup>۴</sup>، خلیل علیزاده<sup>۱</sup>

۱- کارشناسی ارشد، گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، صندوق پستی: ۹۱۷۷۵۱۴۳۶.

۲- دانشیار، گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، صندوق پستی: ۹۱۷۷۵۱۴۳۶.

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، صندوق پستی: ۹۱۷۷۵۱۴۳۶.

۴- کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، صندوق پستی: ۹۱۷۷۵۱۴۳۶.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۱ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۴۰۰/۹/۲۰

### چکیده

تاکنون روش‌های گوناگونی جهت تصفیه پساب‌های صنایع از مواد رنگزا مورد استفاده قرار گرفته است. در این پژوهش، حذف دو رنگزای زانتان به کمک آنزیم لاکاز مورد بررسی قرار گرفته است. لاکازها از جمله آنزیم‌های اکسیدکننده‌ای هستند که به دلیل دارا بودن طیف گسترده سوبسترا، در پژوهش‌های زیادی مورد توجه قرار گرفته است. یکی از توانایی‌های لاکازها، رنگبری رنگ‌های مصنوعی می‌باشد. در این پژوهش، حذف دو رنگزای اریتروسین B و رودامین 6G که عضو دسته زانتان‌ها هستند و همچنین رنگزای قرمز خنثی، به وسیله آنزیم لاکاز اسپوری سویه KC<sub>2</sub> از باکتری باسیلوس (*Bacillus sp*) در مدت زمان تقریبی ۲۴ ساعت، با بهره‌گیری از روش‌های طیفسنجی، اسپکتروفلوریمتری و روبشگر-Z مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آزمایش روبشگر-Z نشان دهنده حذف اریتروسین B از حلال آبی به میزان ۴۵٫۷٪، رودامین 6G به میزان ۴۹٫۱٪ و قرمز خنثی، ۶۸٫۵٪ بود.

واژه‌های کلیدی: رنگبری، رنگزا، روبشگر-Z، لاکاز.

## Study of Bio-decolorization of Xanthene Dyes Using Spore Laccase Based on Laser Spectroscopy

Z. Saberi<sup>1</sup>, S. Sharifi<sup>1\*</sup>, A. Makhdoumi<sup>2</sup>, E. Asadi Shalsabadi<sup>2</sup>, Kh. Alizadeh<sup>1</sup>

1- Department of Physics, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, P. O. Box: 917751436, Mashhad, Iran

2-Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, P. O. Box: 917751436, Mashhad, Iran

Received: 05-01-2020

Accepted: 01-09-2020

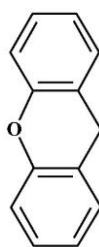
Available online: 11-12-2021

### Abstract

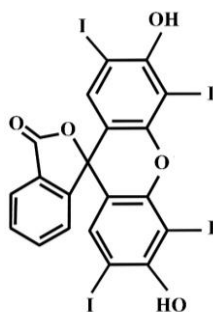
Various methods have been used to treat industrial effluents from dyes. In this study, the removal of two xanthene dyes using laccase enzyme was investigated. Laccases are oxidizing enzymes and have been studied in many studies due to their wide range of substrates. One of the capabilities of laccase is the bleaching of synthetic dyes. In this study, the removal of two dyes, erythrosine B and rhodamine 6G, which are members of the xanthene group, as well as neutral red dye by spore laccase from *Bacillus sp* KC<sub>2</sub> in approximately 24 hours using spectrophotometry, Spectrofluorometry and Z-scan methods were studied. The results of Z-scan showed removal of erythrosine B from aqueous solvent by 45%, rhodamine 6G by 49% and neutral red by 68%. *J. Color Sci. Tech.* 15(2021), 205-214©. Institute for Color Science and Technology.

**Keywords:** Decolorization, Dye, Z-scan, Laccase.

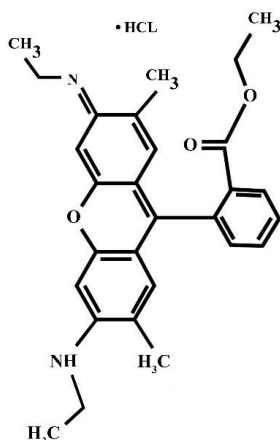
جرم مولی ۸۳۵,۸۹ گرم بر مول، از رنگزاهای زانتان محسوب می‌گردد. این رنگزا در تصویربرداری طول عمر فلورسانس، به عنوان ماده حساس به نور در فوتودینامیک تراپی (PDT) و پروب (آشکارساز) فلورسانس در شیمی، زیست‌شناسی، صنایع غذایی، آرایشی و دارویی مورد استفاده قرار گرفته است. ساختار شیمیایی آن، در شکل ۲ نشان داده شده است. رودامین ۶G (R6G) با فرمول شیمیایی  $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ ، که به آن رودامین ۵۹۰ هم گفته می‌شود، یک رنگزای کاتیونی و عضو دسته زانتان‌ها بوده و جرم مولکولی آن ۴۷۹,۰۱ گرم بر مول می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۱: گروه عاملی زانتان شامل سه حلقه آروماتیک متصل به هم با یک اتم اکسیژن.



شکل ۲: ساختار شیمیایی اریتروسین B دارای گروه عاملی زانتان.



شکل ۳: ساختار شیمیایی رودامین ۶G دارای گروه عاملی زانتان.

## ۱- مقدمه

مواد شیمیایی هنگام ورود به محیط زیست، می‌توانند منجر به آسیب‌های جدی شوند؛ به طوری که سلامت انسان‌ها؛ حتی کل بوم‌سازگان را به خطر بیندازد. رنگ‌ها یک گروه از آلاینده‌ها را تشکیل می‌دهند که می‌توانند با تولید محصولات جانبی سمی، باعث ایجاد مشکلات مختلف زیست‌محیطی شوند [۱].

این نوع از ترکیب‌ها، ساختار شیمیایی پیچیده‌ای دارند و برای رشد میکروارگانیسم‌ها، آنزیم‌ها، موجودهای آبی و زمینی و قارچ‌ها سمی هستند [۲]. معمولاً رنگ‌ها در برابر نور، گرما و اکسیدکننده‌ها پایدار هستند. پسماند رنگ‌هایی که از منابع مختلف (صنایعی همچون نساجی، کاغذ، صنایع واسطه، دارویی، دباغی و ...) ناشی می‌شوند؛ طیف گسترده‌ای از آلاینده‌های آلی را در منابع آب طبیعی یا سیستم‌های تصفیه فاضلاب تشکیل می‌دهند. یکی از منابع اصلی با مشکلات شدید آلودگی در سراسر جهان، صنعت نساجی و فاضلاب‌های حاوی رنگ آن است. تخمین زده می‌شود که ۱۰۰۰۰ رنگ تجاری با برآورد تولید سالانه  $7 \times 10^5$  تن در سراسر جهان تولید می‌شود؛ ۳۰ درصد از این رنگ‌ها بیش از ۱۰۰۰ تن در سال استفاده می‌شود [۳، ۴]. وجود رنگ‌ها یا فرآورده‌های تخریب آن‌ها در آب (حتی با غلظت بسیار کم) می‌تواند باعث به خطر افتادن سلامتی انسان‌ها شود؛ مواردی همچون حالت تهوع، خونریزی، زخم پوستی و غشاهای مخاطی و آسیب به سیستم عصبی مرکزی از جمله این آسیب‌ها به سلامتی می‌باشند. رنگ‌های نساجی با ساختارهای پیچیده، دارای منشأ مصنوعی و طبیعت مقاومی هستند که جدا نمودن آن‌ها از پساب‌های صنعتی، پیش از ورود به محیط‌زیست ضروری است. آلودگی محیط‌زیستی ناشی از فاضلاب صنعتی، در بسیاری از کشورها به یک معضل جدی تبدیل شده است.

رنگ‌های زانتان از قدیمی‌ترین رنگ‌های مصنوعی بوده و کاربردهای فراوانی دارند. این خانواده شامل رنگزاهای اتوزین، فلوکسین، اریتروسین، رودامین ۶G، رز بنگال و غیره، در ساختار خود حاوی گروه عاملی زانتان با فرمول  $C_{28}H_{31}N_2O_3$  هستند (شکل ۱) و معمولاً طول موج جذب آن‌ها در محدوده ۵۰۰ نانومتر می‌باشد (بستگی به نوع ساختار آن‌ها دارد). مشتقات زانتان، مهار میکروبی بالایی دارند [۵]. رودامین‌ها (در گروه زانتان‌ها) در صورت گرم شدن، بخارهای سمی NOx و Cl را انتشار می‌دهند [۶].

اریتروسین B<sup>۲</sup> که به صورت اختصار با ErB نشان داده می‌شود، با

- 1- Eosin
- 2- Phloxin.
- 3- Erythrosin
- 4- Rhodamine 6G
- 5- Rose bengal
- 6- Erythrosin B

روش‌های فیزیکی شامل جذب با کربن فعال، ذغال سنگ نارس، چوب، خاکستر، سیلیس یا فرآیندهایی همچون، فیلتراسیون غشایی، تبادل یونی، انعقاد و اسمز معکوس، با مشکلاتی مانند تولید لجن اضافی مواجه بوده و تنها در مواقعی که حجم پساب کم باشد، مؤثر می‌باشند. روش‌های شیمیایی شامل اکسیداسیون با استفاده از مواد اکسیدکننده همچون، معرف فنتون<sup>۳</sup>، ازن، هیپوکلریت سدیم یا روش‌های فوتوشیمیایی و تخریب الکتروشیمیایی می‌شود. مهم‌ترین مانع استفاده از روش‌های شیمیایی، هزینه بالای آن می‌باشد که از استفاده گسترده آن در صنعت جلوگیری می‌کند.

روش‌های زیستی شامل استفاده از میکروارگانیسم‌هایی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌باشند. تصفیه میکروبی، مقرون به صرفه بوده و توجه زیادی را به خود جلب کرده است. آنزیم‌های اکسیدکننده نیز به طور مستقیم برای تصفیه فاضلاب مورد استفاده قرار گرفته است. روش‌های آنزیمی، فرآیندهای سازگار با محیط‌زیست و کم انرژی هستند، که در طیف وسیعی از pH، درجه حرارت متوسط و وجود مواد آلی، می‌توانند عمل کنند.

آنزیم لاکاز<sup>۴</sup> (benzenediol: oxygen oxidoreductases, EC1.10.3.2) متعلق به خانواده پروتئین‌های اکسیدکننده آبی چند مسی و زیرمجموعه پلی فنل اکسیدازها می‌باشد که اکسیداسیون آرایه‌ای از سوبسترهای آروماتیک را با کاهش اکسیژن مولکولی (O<sub>2</sub>) در نقش پذیرنده الکترون، به آب کاتالیز می‌کند. وجود لاکازها در ساختار طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان مشاهده شده است. طیف زیرلایه‌های لاکاز بسیار گسترده است و می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای در حضور واسطه‌های اکسایش-کاهش گسترش یابد؛ بنابراین، لاکازها پتانسیل امیدوارکننده‌ای در بسیاری از کاربردهای صنعتی و زیست فناوری دارند. در مطالعه‌های انجام شده توسط پژوهشگرها، تجزیه رنگ توسط لاکازها به روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شده و نشان داده شده که شدت طیف جذب در طی فرآیند تجزیه‌ی رنگ، کاهش می‌یابد [۹-۷]. استفاده از آنزیم لاکاز برای رنگبری موادی که با ساختار پیچیده و یا پتانسیل اکسایش-کاهش بالا، امکان ورود به جایگاه فعال آنزیم به طور مستقیم را ندارند؛ بنابراین نیازمند حضور واسطه‌های اکسایش-کاهش دارای وزن مولکولی پایین می‌باشند. در این پژوهش از ماده واسطه‌ی سیرینگالدازین که به طور اختصار با SGZ نشان می‌دهند، استفاده شده است.

روشنگر<sup>۵</sup>-Z روشی ساده و مفید جهت اندازه‌گیری خصوصیات اپتیک غیر خطی مرتبه سوم مواد می‌باشد که در اواخر دهه هشتاد و قرن ۲۰ توسط منصور شیخ بهایی و همکارانش ابداع شد، که اساس آن

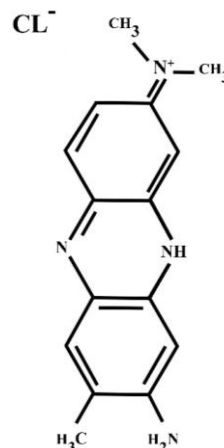
رودامین ۶G از رنگزاهای لیزری مهم و همچنین پروب فلورسانس می‌باشد که بازده کوانتومی فلورسانس قوی در حلال‌های رقیق و جذب قوی در ناحیه مرئی دارد. در غلظت‌های بالا، تمایل بالایی به دایمر شدن و تجمع را از خود نشان می‌دهد.

قرمز خنثی<sup>۱</sup> (NR) با جرم مولی ۲۸۸،۷۸ گرم بر مول یک فنازین<sup>۲</sup> مصنوعی می‌باشد که از بیشتر از یک قرن قبل، کاربردهای فراوانی در چندین رشته پیدا کرده است (فنازین‌ها، گروه بزرگی از ترکیب‌های معطر هتروسیکلیک حاوی نیتروژن را تشکیل می‌دهند که براساس نوع و موقعیت گروه‌های عاملی موجود، خواص شیمیایی و فیزیکی آن‌ها متفاوت است). این رنگزای کاتیونی دارای ساختار آروماتیک سه حلقه‌ای با دو اتم نیتروژن در ساختار حلقه آروماتیک است (شکل ۴).

رودامین ۶G از رنگزاهای لیزری مهم و همچنین پروب فلورسانس می‌باشد که بازده کوانتومی فلورسانس قوی در حلال‌های رقیق و جذب قوی در ناحیه مرئی دارد. در غلظت‌های بالا، تمایل بالایی به دایمر شدن و تجمع را از خود نشان می‌دهد.

قرمز خنثی (NR) با جرم مولی ۲۸۸،۷۸ گرم بر مول یک فنازین مصنوعی می‌باشد که از بیشتر از یک قرن قبل، کاربردهای فراوانی در چندین رشته پیدا کرده است (فنازین‌ها، گروه بزرگی از ترکیب‌های معطر هتروسیکلیک حاوی نیتروژن را تشکیل می‌دهند که براساس نوع و موقعیت گروه‌های عاملی موجود، خواص شیمیایی و فیزیکی آن‌ها متفاوت است). این رنگزای کاتیونی دارای ساختار آروماتیک سه حلقه‌ای با دو اتم نیتروژن در ساختار حلقه آروماتیک است (شکل ۴). روش‌های مختلفی جهت حذف رنگ و رنگبری وجود دارد و هر روش مزایا و نقاط ضعف خود را دارد.

به علت ساختمان مولکولی پیچیده و مقاوم رنگ‌ها، تصفیه فاضلاب‌های رنگی با دشواری‌هایی همراه بوده است. این روش‌ها به‌طور گسترده در سه دسته فیزیکی، شیمیایی و زیستی قرار می‌گیرند.



شکل ۴: ساختار شیمیایی قرمز خنثی با گروه عاملی فنازین.

3- Fenton's reagent

4- Laccase

5- Z-scan

1- Neutral red

2- Phenazine

باکتری لاکاز-مثبت Bacillus atrophaeus KC2 از آب دریای خزر توسط اسدی و همکارانش (در سال ۲۰۱۵) جداسازی شده است [۱۳]. در محیط کشت اسپوری، به وسیله سانتریفیوژ (SIGMA) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، باکتری از محیط کشت جداسازی شد. پس از شست و شوی رسوب با آب مقطر، مجدداً سانتریفیوژ شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه داخل دستگاه بن ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده که این دما، منجر به از بین رفتن سلول‌های رویشی گردیده و تنها سلول‌های اسپوری واجد لاکاز باقی می‌ماند. سوسپانسیون تهیه شده باید در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.

پودر سیرینگالدازین به عنوان واسطه اکسایش در ۱۰ میلی لیتر اتانل ۹۶ درصد حل شده است (غلظت ۱,۲ میلی مولار). غلظت نهایی سوبسترا در تمام محلول‌های حاوی آنزیم، ۰,۱ میلی مولار در نظر گرفته شده است. همچنین از سیرینگالدازین برای اثبات وجود آنزیم لاکاز در محلول اسپوری تهیه شده، استفاده گردید. برای هر رنگزا دو نوع محلول تهیه شده است؛ الف) محلول آبی شامل رنگزا و آب دیونیزه، ب) محلول شامل رنگزا، آب، بافر (سیترات-فسفات ۰,۱ میلی مولار)، آنزیم لاکاز و سیرینگالدازین. همه محلول‌ها در شیکر انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد و تعداد ۱۵۰ دور بر دقیقه) نگهداری گردید. جهت انجام آزمون‌ها (طیف جذب و نشر و روبشگر-Z) در زمان‌های مشخص با سمپلر، حجم مشخصی از محلول را برداشته و داخل میکروتیوب ریخته و جهت جداسازی اسپور از محلول، آن را به مدت ۵ دقیقه با تعداد دور ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفیوژ کردیم. ضریب جذب غیر خطی تمام محلول‌ها در دقایق مشخصی از زمان آماده‌سازی و حداکثر تا ۲۴ ساعت به وسیله دستگاه روبشگر-Z اندازه‌گیری شده است. طیف‌های جذب و فلورسانس محلول‌ها نیز بررسی گردیده است.

## ۲-۲-۲ روش روبشگر-Z

دستگاه روبشگر-Z مورد استفاده در این پژوهش دارای منبع لیزر دیودی نئودیمیم یاگ با طول موج پیوسته ۵۳۲ نانومتر (به رنگ سبز) و شعاع پرتو گاوسی (۱,۴ میکرومتر=mm) و توان ۸۰ میلی‌وات بوده و فاصله کانونی عدسی همگراکننده آن ۵ سانتی‌متر می‌باشد. نمونه به شکل مایع درون یک سل از جنس کوارتز به ضخامت ۰,۱ میلی‌متر ریخته شده و در جایگاه مخصوص که قابلیت حرکت روی ریل را دارد، قرار داده می‌شود و سپس شدت نور عبور کرده از آن توسط آشکارسازهای باز و بسته اندازه‌گیری و داده‌ها توسط کامپیوتر ذخیره می‌شوند. با استفاده از رابطه تراگسیلندگی (۱) مربوط به آشکارساز دهانه باز، مقدار ضریب جذب غیرخطی محاسبه می‌شود [۱۰].

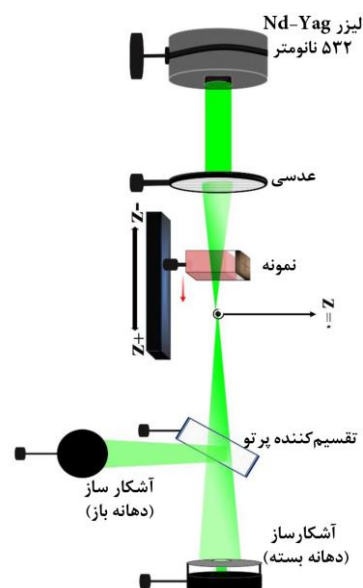
بر پایه اثر خودکانونگی می‌باشد [۱۰]. چیدمان دستگاه روبشگر-Z در شکل ۵ نشان داده شده است. یک پرتوی گوسی لیزر، در مد مرتبه اول، پس از عبور از یک عدسی همگراکننده، به نمونه غیرخطی تابانده می‌شود. نمونه می‌تواند نسبت به نقطه کانونی در امتداد محور پرتوی نوری حرکت کند. نور گذرنده از نمونه توسط یک تقسیم‌کننده پرتو به دو قسمت تقسیم می‌شود؛ آشکارساز ۲ (دهانه باز)، برای اندازه‌گیری شدت نور عبوری از نمونه و آشکارساز ۱ (دهانه بسته) برای اندازه‌گیری کسری از شدت نور عبور کرده از نمونه کاربرد دارند.

در این مطالعه، خصوصیات نوری خطی و غیرخطی سه رنگزای اریتروسین B، رودامین ۶G و قرمز خنثی، آنالیز و از تکنیک روبشگر-Z جهت مطالعه رنگبری، مورد استفاده قرار گرفته است؛ به طوری که تغییر در میزان ضریب جذب غیر خطی رنگزاها، نشان دهنده تغییر غلظت محلول در اثر اکسایش مولکول‌های رنگزا می‌باشد. مطالعه‌های انجام گرفته نشان می‌دهد که مقادیر خصوصیات نوری این رنگزاها وابسته به غلظت هستند [۱۱، ۱۲].

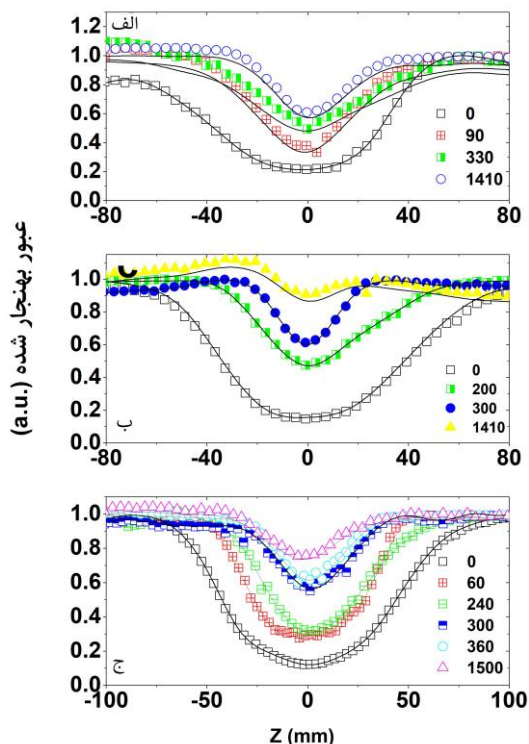
## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱- مواد و روش‌ها

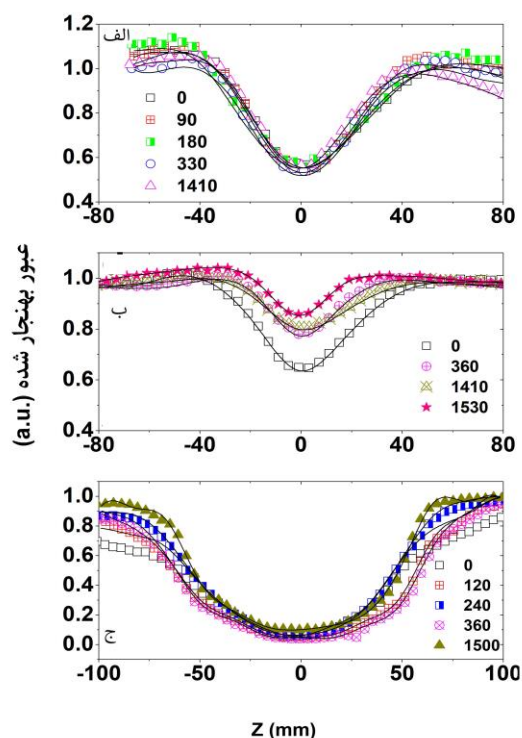
رنگزاهای اریتروسین B، رودامین ۶G و قرمز خنثی و سیرینگالدازین به شکل پودر جامد از شرکت سیگما خریداری شده است. آب دیونیزه با وزن مولکولی ۱۸,۰۲ گرم بر مول، چگالی ۹۹۸ گرم بر لیتر، ثابت دی الکتریک ۸۰,۴۰ و ضریب شکست ۱,۳۳ و همچنین آب مقطر (جهت آماده‌سازی محیط کشت و سوسپانسیون اسپوری) نیز در این پژوهش استفاده شده است.



شکل ۵: چیدمان دستگاه روبشگر-Z (شامل منبع لیزر، عدسی، آشکارسازهای دهانه باز و بسته) [۱۱، ۱۲].



شکل ۶: نمودار تغییرات شدت عبوری از آشکارساز دهانه باز روبشگر-z بر حسب مکان در زمان‌های مختلف (با آنزیم)، الف) ErB با غلظت ۰,۰۴ میلی‌مولار، ب) R6G با غلظت ۰,۰۶ میلی‌مولار، ج) NR با غلظت ۰,۲ میلی‌مولار.



شکل ۷: نمودار تغییرات شدت عبوری از آشکارساز دهانه باز روبشگر-z بر حسب مکان در زمان‌های مختلف (بدون آنزیم)، الف) ErB با غلظت ۰,۰۴ میلی‌مولار، ب) R6G با غلظت ۰,۰۶ میلی‌مولار، ج) NR با غلظت ۰,۲ میلی‌مولار.

$$T_{OA} = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-q_0(z))^m}{(m+1)^{r/\tau}} \quad (1)$$

که  $q_0$  عبارت است از:

$$q_1 = \beta I_0 L_{eff} \left( 1 + \left( \frac{z}{z_0} \right)^2 \right)^{-1} \quad (2)$$

در این روابط،  $I$  شدت پرتوی اولیه،  $L_{eff}$  ضخامت مؤثر نمونه،  $\beta$  ضریب جذب غیر خطی و  $z$  طول کمر باریکه لیزر است. با مشخص بودن این مقادیر و یک مقدار تخمینی برای  $\beta$ ، می‌توان نمودار تراگسیلندگی بهنجار شده را بر حسب  $z$  رسم و با برازش آن با نمودار داده‌های تجربی، مقدار ضریب جذب غیر خطی را محاسبه نمود.

### ۳-۲- طیف‌سنجی جذبی و نشری

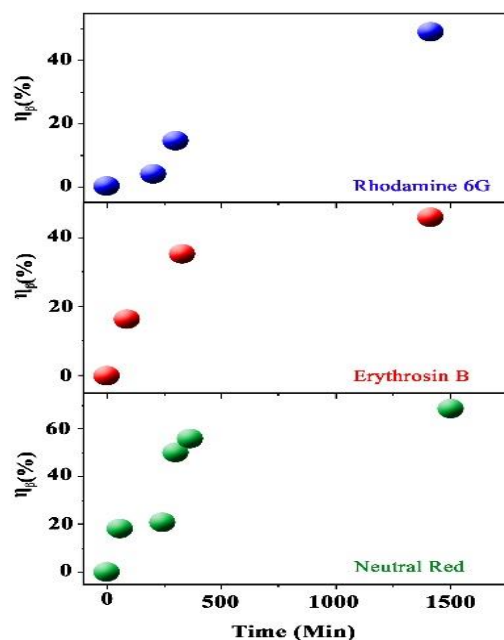
طیف‌های جذب و فلورسانس محلول‌ها به ترتیب توسط دستگاه طیف‌سنج دو پرتویی Shimadzu مدل UV-Vis 2450 و دستگاه طیف‌سنج Jasco مدل FP-6200 بررسی شد.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- روبشگر-z

منحنی‌های روبشگر-z دهانه باز برای سه رنگزا در زمان‌های مختلف، برای محلول‌ها با و بدون آنزیم در شکل‌های ۶ و ۷ قابل مشاهده است. منحنی دهانه باز ErB حاوی آنزیم در شکل ۶ و بدون آنزیم در شکل ۷ نشان داده شده است. عمق منحنی دهانه باز ( $\Delta T_{OA}$ ) در محلول ErB همراه با آنزیم با زمان کاهش داشته (شکل ۶ الف)، در حالی که عمق منحنی دهانه باز ErB بدون آنزیم بین ۰ تا ۱۴۱۰ دقیقه، تغییری نداشته است (شکل ۷ الف). منحنی‌های دهانه باز R6G با و بدون آنزیم در طول زمان تغییر داشته‌اند (شکل ۶ و ۷ ب) و منحنی دهانه باز محلول NR شبیه ErB است (شکل ۶ و ۷ ج). پس از برازش منحنی‌های دهانه باز، مقادیر ضریب جذب غیرخطی با استفاده از روابط ۱ و ۲ محاسبه می‌شود؛ این مقادیر در جدول ۱ آورده شده است. درصد تجزیه رنگ می‌تواند از رابطه ۳ استخراج شود.

$$\eta_{\beta} = \frac{(\beta_0 - \beta_1)}{\beta_0} \times 100 \quad (1)$$



شکل ۸: درصد رنگ‌زدایی بر اساس ضریب جذب غیرخطی ( $\eta_B$ ) از محلول‌های حاوی آنزیم رودامین ۶G با غلظت ۰,۰۶ میلی‌مولار، اریتروسین B با غلظت ۰,۰۴ میلی‌مولار و قرمز خنثی با غلظت ۰,۲ میلی‌مولار.

که در آن،  $\beta_0$  و  $\beta_t$  به ترتیب ضرایب جذب غیرخطی رنگ‌ها در زمان صفر و  $t$  هستند. شکل ۸،  $\eta_B$  را به عنوان تابعی از زمان برای سه رنگینه در محلول‌های حاوی آنزیم نشان می‌دهد. نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که مقادیر  $\eta_B$  با زمان افزایش می‌یابد و بیشترین تغییرها برای قرمز خنثی مشاهده شده است؛ به طوری که برای اریتروسین B، بیشترین تغییرات  $\beta$  در محلول حاوی آنزیم نسبت به دقیقه‌ی صفر به میزان ۴۵,۶۹۲٪ در دقیقه ۱۴۱۰، برای رودامین ۶G، ۴۹,۰۵۹٪ در دقیقه ۱۴۱۰ و برای قرمز خنثی ۶۸,۵۳۹٪ در دقیقه ۱۴۱۰ رخ داده است.

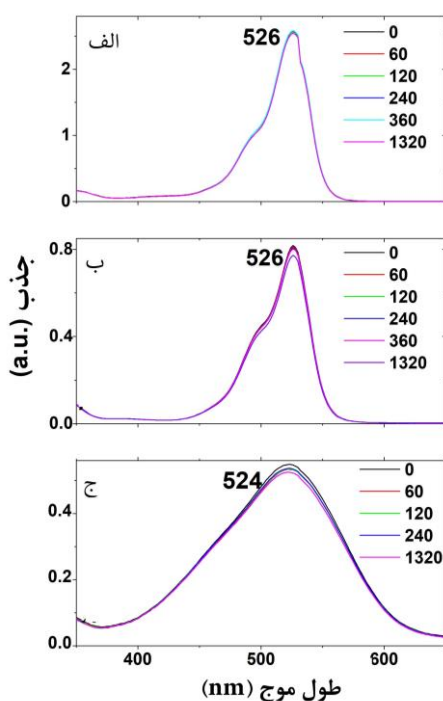
نمودارهای مربوط به مطالعه رنگبری رنگزاهای NR و R6G، ErB با استفاده از طیف‌سنجی در شکل ۹ قابل مشاهده هستند. در زمان‌های کمتر از ۳۰۰ دقیقه، طیف‌های جذب به مرور تغییرات اندکی داشته‌اند؛ در حالی که مقادیر  $\eta_B$ ، ۱۴٪ برای R6G، ۳۵٪ برای EryB و ۴۹٪ برای NR در دقیقه ۳۰۰ هستند.

جدول ۱: ضرایب جذب غیرخطی رنگزاهای ضریب جذب در محلول حاوی آنزیم (A1 با آنزیم، A2 بدون آنزیم).

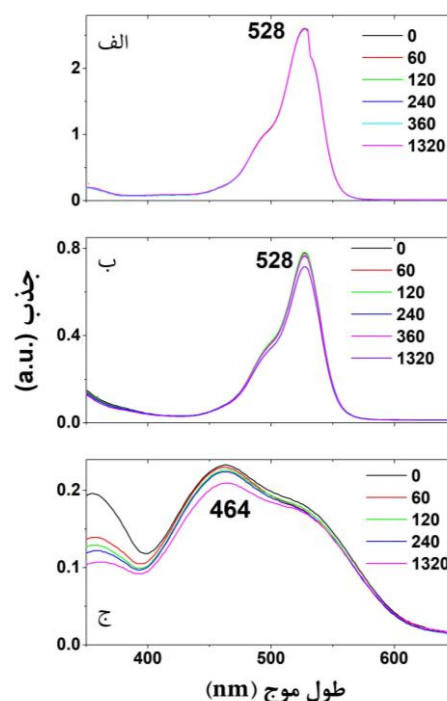
	$\Delta t$ (min)	B ( $\times 10^{-7}$ cm/w)	$\beta / \beta_0$	%
Ery B	۰	۶,۶۲۵۳۴	۱	۰
	۹۰	۵,۵۵۱۸۵	۰,۸۳۷۹۷	۱۶,۲۰۳
	۳۳۰	۴,۲۹۵۱۱	۰,۶۴۸۲۹	۳۵,۱۷۱
	۱۴۱۰	۳,۵۹۸۱۲	۰,۵۴۳۰۸	۴۵,۶۹۲
A2	۰	۴,۰۲۲۳۵	۱	
	۹۰	۴,۰۲۲۳۵	۱	
	۱۸۰	۴,۰۲۲۳۵	۱	
	۳۳۰	۴,۰۲۲۳۵	۱	
A1	۱۴۱۰	۴,۰۲۲۳۵	۱	
	۰	۷,۰۵۳۹۷	۱	۰
	۲۰۰	۴,۴۶۵۳۷	۰,۶۳۳۰۳	۳,۹۸۵۰۸
	۳۰۰	۳,۳۲۳۴۲	۰,۴۷۱۱۴	۱۴,۲۳۳۷
R6G	۱۴۱۰	۱,۷۷۴۶۶	۰,۲۵۱۵۸	۴۹,۰۵۹۴۷
	۰	۳,۰۸۷۷۴	۱	
	۳۶۰	۱,۸۷۹۷۲	۰,۶۰۸۷۷	
	۱۴۱۰	۱,۶۹۶۱۹	۰,۵۴۹۳۳	
A2	۱۵۳۰	۱,۵۲۴۹۴	۰,۴۹۳۸۷	

(ادامه جدول ۱)

	$\Delta t$ (min)	B ( $\times 10^{-7}$ cm/w)	$\beta / \beta_0$	%
	۰	۷,۳۴۳۴۵	۱	۰
A1	۶۰	۶,۰۲۲۳۱	۰,۸۲۰۰۹	۱۷,۹۹۱
	۲۴۰	۵,۸۱۴۲۹	۰,۷۹۱۷۷	۲۰,۸۲۳
	۳۰۰	۳,۶۸۸۲۲	۰,۵۰۲۲۵	۴۹,۷۷۵
	۳۶۰	۳,۲۴۱۴۸	۰,۴۴۱۴۱	۵۵,۸۵۹
NR	۱۵۰۰	۲,۳۱۰۳۴	۰,۳۱۴۶۱	۶۸,۵۳۹
	۰	۷,۸۵۳۰۳	۱	
	۱۲۰	۷,۸۵۳۰۳	۱	
	۲۴۰	۷,۸۵۳۰۳	۱	
A2	۳۶۰	۷,۸۵۳۰۳	۱	
	۱۵۰۰	۷,۸۵۳۰۳	۱	



شکل ۱۰: الف) طیف جذب ErB در محلول آبی با غلظت ۰,۲ میلی مولار، ب) R6G با غلظت ۰,۰۶ میلی مولار و ج) NR با غلظت ۰,۲ میلی مولار در زمان‌های مختلف (بدون آنزیم).



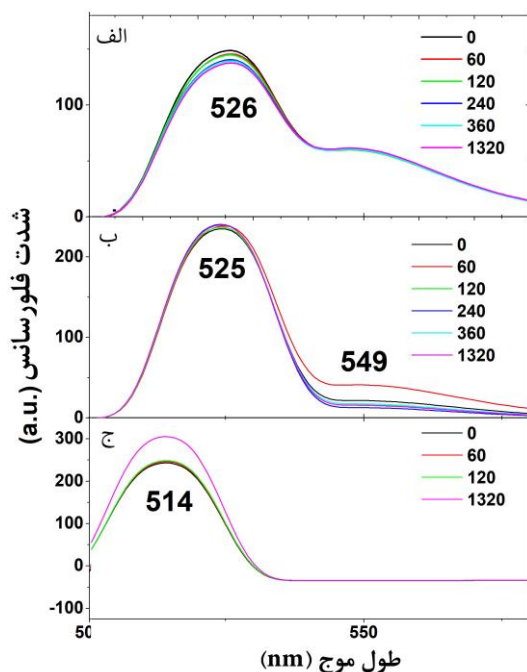
شکل ۹: الف) طیف جذب ErB در محلول آبی با غلظت ۰,۲ میلی مولار، ب) R6G با غلظت ۰,۰۶ میلی مولار و ج) NR با غلظت ۰,۲ میلی مولار در زمان‌های مختلف (با آنزیم).

### ۳-۲- طیف جذب

در میزان جذب EryB با زمان در محلول حاوی آنزیم، نسبت به محلول بدون آنزیم، تغییری مشاهده نمی‌شود، که می‌تواند به علت غلظت بالای رنگزا باشد (۰,۲ میلی مولار) [۱۴].

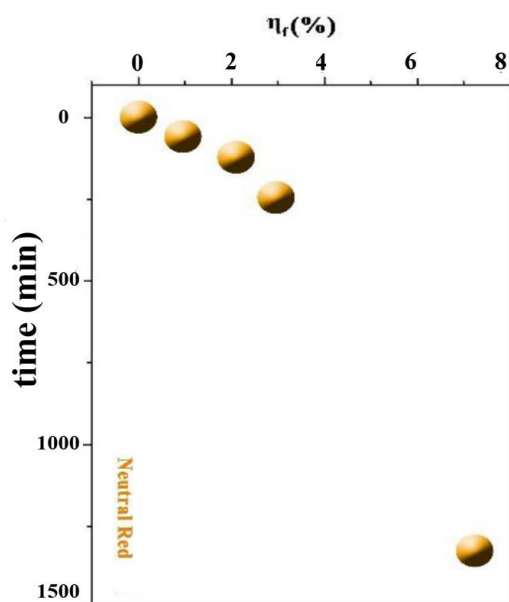
بیشینه جذب برای محلول بدون آنزیم NR (شکل ۱۰ ج) در طول موج ۵۲۴ نانومتر بوده؛ اما در محلول حاوی آنزیم، بیشینه به ۴۶۴ نانومتر جابجا شده و همچنین شدت بیشینه با زمان کاهش یافته است (شکل ۹ ج).





شکل ۱۲: طیف نشری (الف) اریتروسین B با غلظت ۰,۰۰۸ میلی مولار، (ب) رودامین ۶G با غلظت ۰,۰۰۰۱۲ میلی مولار، (ج) قرمز خنثی با غلظت ۰,۰۱ میلی مولار (بدون آنزیم).

نمودار  $\eta_f$  به عنوان تابعی از زمان در شکل ۱۳ نشان داده شده است. مقدار  $\eta_f$  در دقیقه ۲۴۰، برابر با ۲,۹٪ است که با مقادیر  $\eta_B$  به دست آمده توسط دستگاه روبشگر Z-متفاوت است.



شکل ۱۳: درصد رنگبری بر اساس تغییرات شدت فلورسانس قرمز خنثی در محلول حاوی آنزیم در زمان‌های مختلف برای ترکیب قرمز خنثی با غلظت ۰,۰۱ میلی مولار.

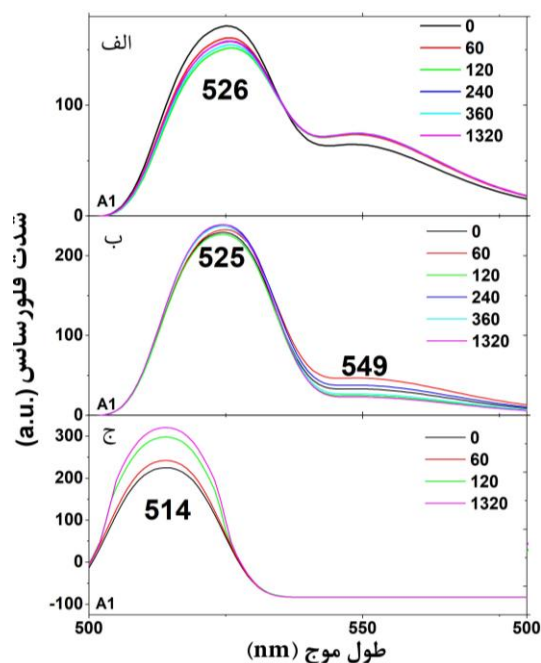
### ۳-۳- طیف نشر

نمودارهای مربوط به مطالعه رنگبری رنگزاهای ErB، R6G و NR بر اساس روش اسپکتروفلورومتری در شکل ۱۱ و ۱۲ قابل مشاهده هستند. تغییرات اولیه در طیف فلورسانس، در روز دوم مطالعه مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که اسپکتروفتومتر و اسپکتروفلورومتری، ابزار مفیدی جهت مطالعه رنگبری در زمان‌های کمتر از ۲۴ ساعت نیستند.

در شکل ۱۱، شدت فلورسانس برای R6G (با غلظت اولیه ۰,۰۰۰۱۲ میلی مولار) با گذشت زمان، مقدار کمی افزایش و برای ErB (با غلظت اولیه ۰,۰۰۸ میلی مولار) اندکی کاهش می‌یابد که مطالعه تجزیه رنگ را دشوار می‌کند؛ در حالی که شدت فلورسانس NR (غلظت اولیه ۰,۰۱ میلی مولار) به مرور زمان افزایش می‌یابد، که دلیل آن کاهش سطح تجمع رنگزا در محلول حاوی آنزیم است.

نتایج نشان می‌دهد که تجمع مولکول‌های NR، در ۰,۰۱ میلی مولار رخ می‌دهد و آنزیم می‌تواند باعث کاهش تعداد NR در محلول شود و با کاهش تعداد رنگ در محلول‌ها، تجمع کاهش می‌یابد.

میزان رنگبری بر اساس طیف‌سنجی نشری  $\eta_f$  برای NR که بیشترین تغییرات را در بین سه رنگزا دارد، در نظر گرفته شده است.



شکل ۱۱: طیف نشری (الف) اریتروسین B با غلظت ۰,۰۰۸ میلی مولار، (ب) رودامین ۶G با غلظت ۰,۰۰۰۱۲ میلی مولار، (ج) قرمز خنثی با غلظت ۰,۰۱ میلی مولار (با آنزیم).



کشت مایع را ارزیابی کردند. پس از گذشت ۱۴ روز، میزان رنگ بری فلونورسین، ۴-آمینوفلورسین و ۵-آمینوفلورسین به ترتیب ۸۵،۰٪، ۹۵،۰٪ و ۹۱،۹٪ بود؛ علاوه بر این، هیچ رنگ‌زدایی در مورد رنگزاهای رودامین B، هیدرات رودامین ۱۲۳ و رودامین ۶G مشاهده نشد. سه رنگ اول با عصاره سلولی از قارچ رنگین‌کمان، رنگ‌زدایی شد. فعالیت تجزیه رنگی به ترتیب ۱،۰،۲، ۶،۷ و ۷،۲ میکرو مولار بر دقیقه بر میلی گرم بود.

در پژوهشی در زمینه رنگبری رنگزای رودامین B با لاکاز اسپوری سویه KC2، نشان داده شد که در غلظت‌های بالا (۰،۰۵ میلی مولار)، طیف جذبی قادر به نشان دادن تغییرات نیست [۱۴]؛ تغییرات اندک طیف جذب سه رنگینه نیز می‌تواند به همین دلیل باشد. معمولاً در رنگبری از طیف جذبی استفاده می‌شود [۲۶-۲۴]. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که بررسی تغییرات جذب غیرخطی نیز می‌تواند یکی از روش‌های مناسب جهت مطالعه رنگبری باشد.

#### ۴- نتیجه‌گیری

حذف سه رنگزای اریتروسین B، رودامین ۶G و قرمز خنثی بر اساس طیف‌سنجی جذبی و نشری و روش روبشگر-Z بررسی شد. از آنزیم لاکاز برای رنگبری از محلول آبی رنگزاهای استفاده شده و محلول آبی بدون آنزیم نیز جهت مقایسه نتایج، تهیه گردید. نتایج در ۳۰۰ دقیقه اول، نشان دهنده تغییرات ضریب جذب غیرخطی چشمگیرتر می‌باشد؛ در صورتی که طیف جذبی و طیف فلورسانس، قادر به مشاهده این تغییرات نمی‌باشد. تنها در زمان‌های بیشتر از ۳۰۰ دقیقه، تغییرات طیف فلورسانس دو رنگزای اریتروسین B و رودامین ۶G اندک بوده؛ اما قرمز خنثی تغییرات بیشتری نشان داده و شدت فلورسانس آن با گذشت زمان افزایش یافت، که می‌تواند به علت کاهش غلظت رنگزا در محلول، بر اثر اکسایش با آنزیم لاکاز باشد. با مقایسه طیف‌سنجی‌های نوری مختلف، روش روبشگر-Z به عنوان روش مناسب جهت مطالعه رنگبری در زمان‌های نخستین معرفی گردیده است.

روش روبشگر-Z و بررسی خصوصیات اپتیکی غیرخطی رنگزاهای ابزار مفیدی جهت مطالعه رنگبری بوده و مقایسه نتایج، نشان دهنده حساسیت بیشتر دستگاه روبشگر-Z نسبت به طیف‌سنجی جذبی و نشری جهت مطالعه رنگبری در زمان‌های کمتر از ۲۴ ساعت می‌باشد.

#### تشکر و قدردانی

از دانشگاه فردوسی مشهد جهت حمایت مالی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

غلظت اولیه دو رنگزای رودامین ۶G و قرمز خنثی در آزمایش‌های طیف جذب و روبشگر-Z، یکسان و به ترتیب ۰،۰۶ میلی مولار و ۰،۲ میلی مولار می‌باشد؛ در این غلظت‌ها، طیف‌های جذب تغییرات بسیار اندکی داشتند که نتایج قابل اطمینانی برای ارزیابی میزان رنگبری به دست نمی‌دهد؛ اما در همین غلظت‌ها، نتایج روبشگر-Z تغییرات حاصل از واکنش آنزیم با رنگزاهای را نشان داد. قرمز خنثی در مقایسه با رودامین ۶G و اریتروسین B، تغییرات بیشتری در ضریب جذب غیر خطی داشت؛ این اختلاف می‌تواند به اثر سمی دو رنگزای زانتان بر فعالیت آنزیمی نسبت داده شود.

پژوهشی در زمینه بررسی توانایی آنزیم نوترکیب لاکاز به دست آمده از نوعی قارچ پوسیده سفید (*Lenzites gibbosa*)، در تجزیه چندین رنگ متفاوت شیمیایی انجام شده است؛ در این پژوهش، میزان رنگبری رنگزای قرمز خنثی در حضور واسطه‌های واکنش پس از ۱۸ ساعت به میزان ۶۰٪ اندازه‌گیری شده است [۱۵]. تفاوت در میزان رنگبری می‌تواند به تفاوت در ساختار شیمیایی رنگزاهای مربوط باشد [۱۶]. سمیت رنگ‌های خاص، کانی‌سازی کامل را مهار می‌کند. گزارش شده است که رنگ‌های زانتان برای گونه‌های مختلفی که در شرایط آزمایشگاهی آزمایش می‌شوند، سمی هستند. گزارش‌های متعددی در مورد اکسیداسیون آنزیمی رنگ‌های زانتان موجود است [۲۰-۱۷]

با افزایش غلظت رنگ، میزان تجزیه و اکسایش به تدریج کاهش می‌یابد؛ این اتفاق می‌تواند به اثرات سمی رنگ روی باکتری مربوط باشد که منجر به نسبت سلول به رنگ ناکافی می‌شود. غلظت رنگ می‌تواند از طریق ترکیبی از عوامل، از جمله سمیت رنگ در غلظت‌های بالاتر، کارایی حذف رنگ را تحت تأثیر قرار دهد [۲۱]. در یکی از مطالعه‌های پیشین، سرعت بالای تجزیه رنگ توسط باکتری سودوموناس<sup>۱</sup> در مراحل اولیه مشاهده شد، که به تدریج با افزایش غلظت رنگ راکتیو قرمز<sup>۲</sup> کاهش می‌یابد [۲۲]. گزارش شده است که اثر سمی غلظت بالای رنگ، در صورت استفاده از روش "هم‌کشتی"<sup>۳</sup> به جای روش کشت خالص باکتری، کاهش می‌یابد و این ممکن است به دلیل اثر هم‌افزایی میکروارگانیزم‌ها باشد که احتمالاً غلظت متابولیت‌های سمی را کاهش داده یا اثر سمی آنها را تغییر می‌دهد [۲۳].

یاتوم و ایتو<sup>۴</sup> میزان رنگ‌زدایی شش رنگ زانتان (۱۰۰ میکرو مولار)، توسط قارچ رنگین‌کمان<sup>۵</sup> (یک قارچ پوسیدگی سفید) در

- 1- *Pseudomonas* sp. SUK-1
- 2- Reactive Red 5
- 3- Co-culture
- 4- Yatome, Itoh
- 5- *Coriolus versicolor*

## ۵- مراجع

1. S. Abo-Farha, Photocatalytic degradation of monoazo and diazo dyes in wastewater on nanometer-sized TiO<sub>2</sub>, *J. Am. Sci.* 6(2010), 42-130.
2. L. C. Apostol, L. Pereira, R. Pereira, M. Gavrilesu, M. M. Alves, Biological decolorization of xanthene dyes by anaerobic granular biomass. *Biodegrad.* 23(2012), 725-737.
3. A. Baban, A. Yediler, N. K. Ciliz, Integrated water management and CP implementation for wool and textile blend processes. *Clean-Soil Air Water.* 38(2010), 84-90.
4. T. Robinson, G. McMullan, R. Marchant, P. Nigam, Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour. Technol.* 77(2001), 247-255.
5. H. Wang, L. Lu, S. Zhu, Y. Li, W. Cai, The phototoxicity of xanthene derivatives against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* 52(2006), 1-5.
6. R. J. Lewis, Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 5 Volume Set, 12<sup>th</sup> Edition, New York, 2012.
7. R. L. Singh, P. K. Singh, R. P. Singh, Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes—A review, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 104(2015), 21-31.
8. E. Abadulla, T. Tzanov, S. Costa, K.-H. Robra, A. Cavaco-Paulo, G. M. Gübitz, Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2000), 3357-3362.
9. A. Kandelbauer, O. Maute, R. W. Kessler, A. Erlacher, G. M. Gübitz, Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.* 87(2004), 552-563.
10. K. Milanchian, H. Tajalli, A. G. Gilani, M. Zakerhamidi, Nonlinear optical properties of two oxazine dyes in aqueous solution and polyacrylamide hydrogel using single beam Z-scan. *Opt. Mater.* 32(2009), 12-17.
11. M. Pourtabrizi, N. Shahtahmassebi, A. Kompany, S. Sharifi, Enhancement of linear and non-linear optical properties of erythrosin b by nano-droplet. *Opt. Quantum Electron.* 50, 1-15, 2018.
12. K. Vahedi, S. Sharifi, K. Alizadeh, O. Marti, M. Amirkhani, Enhancement of nonlinear optical response and fluorescence spectra of cationic neutral red by anionic surfactant. *Opt. Quantum Electron.* 50(2018), 24.
۱۳. ش. آبادی، جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد آنزیم لاکاز از دستگاه گوارش لارو سوسک سرشاخه خوار *Osphranteria coerulescens* و سایر محیط‌های واجد لیگنین، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، شهریور ۱۳۹۴
14. E. A. Shamsabadi, A. Azarpour, A. Makhdomi, S. Sharifi, Z-Scan and Absorption Study of Crocin and Rhodamine B Decolorization by Bacterial Laccase. *J. Fluoresc.* 28(2018), 1093-1103.
15. M. Zheng, Y. Chi, H. Yi., Shao, Decolorization of Alizarin Red and other synthetic dyes by a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 36(2014), 39-45.
16. H. Claus, G. Faber, H. König, Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59(2002), 672-678.
17. S. N. Krylov, A. B. Chebotareva, Peroxidase-catalyzed co-oxidation of indole-3-acetic acid and xanthene dyes in the absence of hydrogen peroxide. *FEBS lett.* 324(1993), 6-8.
18. L. Chan, B. Jinghua, L. Youqi, L. Lin, Identification and properties of xanthene dye decolorization of *Aspergillus wentii* wehmer HD- (1). *Jun wu xi Tong.* 18(1999), 67-72.
19. J. Lan, High efficient degradation of dyes with lignin peroxidase coupled with glucose oxidase. *J. Biotechnol.* 123(2006), 483-490.
20. S. Khammuang, R. Sarnthima, "Mediator-assisted Rhodamine B decolorization by *Trametes versicolor* laccase. *Pak. J. Biol. Sci.* 12(2009), 616-623.
21. S. Jadhav, S. Kalme, S. Govindwar, Biodegradation of methyl red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 62(2008), 135-142.
22. D. C. Kalyani, P. S. Patil, J. P. Jadhav, S. P. Govindwar, Biodegradation of reactive textile dye Red BLI by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SUK1, *Bioresour. Technol.* 99(2008), 4635-4641.
23. R. Saratale, G. Saratale, J. S. Chang, S. Govindwar, "Decolorization and biodegradation of textile dye Navy blue HER by *Trichosporon beigelii* NCIM-3326". *J. Hazard. Mater.* 166(2009), 1421-1428, 2009.
۲۴. ا. دهنوخلجی، بررسی حذف ماده رنگزای متیل سبز با استفاده از نانوذرات اکسید نیکل. *نشریه علمی علوم و فناوری رنگ.* ۱۵(۱۴۰۰)، ۷۷-۷۱.
۲۵. م. مهریزی، ز. شاهی، مطالعه عوامل مؤثر بر حذف فلزات سنگین از پساب با استفاده از مواد جاذب (زیستی-طبیعی). *نشریه علمی مطالعات در دنیای رنگ.* ۹(۱۳۹۸)، ۲۶-۱۵.
۲۶. ع. غلامی آکردی، س. هژیر بهرامی، م. آرامی، ن. نورمحمدی، حذف رنگزای کاتیونی از پساب های نساجی با استفاده از نانوذرات مغناطیس و الکترودهای کربنی اصلاح شده با اکسیدگرافن احیا شده به روش الکتروفنتون ناهمگن. *نشریه علمی علوم و فناوری رنگ.* ۱۵(۱۴۰۰)، ۱۱-۱.